

た。ギャップ結合細胞間連絡機能は、V79細胞代謝協同阻害試験<sup>1)</sup>およびルシフェルイエローの蛍光色素を用いて、色素が細胞間連絡により、移行する距離を測る方法 (SLDT assay)<sup>2)</sup>の2種類の試験方法を用いて阻害活性を測定した。ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸AおよびCとコンドロイチン硫酸B (デルマタン硫酸) は生化学工業で精製されたものを使用した。

ヒアルロン酸をコーティングしたシャーレでヒト皮膚線維芽細胞を培養した結果、ヒアルロン酸の異なる分子量によって、初期段階での細胞接着時間に大きな差があることが明らかになった。分子量4千8百のヒアルロン酸では、4時間以内で半分以上の細胞が接着したのに対し、ヒアルロン酸の分子量が80万になると48時間以上の培養時間が必要であった。この原因は、ヒアルロン酸の分子量が大きくなるに従って、溶液中の多糖分子内での高次構造形成が進行し、分子量が大きい多糖類をコーティングしたシャーレ表面のアニオン性荷電密度が高くなった結果だと思われる<sup>2)</sup>。表面構造を原子間顕微鏡で観察すると、低分子量ヒアルロン酸では、比較的均一な表面構造が観察されたが、高分子量のヒアルロン酸では分子のからみあいによる高次構造形成を示すAFM像が観察された。高さのプロファイル解析では、分子量4,800では5nm、分子量80万では、約10nmを示し、分子量が大きくなると高次構造をとることにより、表面が平坦でないAFM像を示すことが

明らかになった。ヒアルロン酸の分子量が大きくなると島状のドメインを示し、各ドメインの大きさを示す距離は、約20nmであった<sup>2)</sup>。このように、ヒアルロン酸は、分子量や導入方法の違いによって細胞の接着・伸展・増殖への影響が異なる。

コンドロイチン硫酸の場合、コンドロイチン硫酸AおよびCを添加した群では、細胞間連絡機能を20-40%阻害したが、コンドロイチン硫酸B (デルマタン硫酸) では阻害しなかった。更に、コンドロイチン硫酸Aをコーティングしたデイスユ上で阻害が認められたものの、コンドロイチン硫酸B (デルマタン硫酸) およびCをコーティングした場合には、大きな差は認められなかった。しかし、多糖類であるヒアルロン酸を単純に培地中に添加した方が、ヒアルロン酸をシャーレにコーティングした場合より、ギャップ結合を介した細胞間連絡能が低下することが確認された<sup>2)</sup>。一方、alarBlueTM assayで測定した細胞の生育活性には、これらのいずれの条件においても、コントロールであるカルチャーデイスユと同程度の生育活性を示した<sup>2)</sup>。多糖類を添加したデイスユでは、培地中の血清成分と添加した多糖類が相互作用し、ギャップ機能に重要な血清成分中のサイトカイン等の細胞への取り込みが一部低下した結果だと考えられる。分子量80万のヒアルロン酸でコーティングした場合には、同分子量のヒアルロン酸を培地中に添加した時に比べて、細胞は伸展し、良好な増殖を示した。多糖類からなるドメイ

ンに吸着された血清成分が生体での細胞外マトリックスのような働きによって、細胞の増殖・伸展に影響を与えることが予想される。次に、異なる分子量のヒアルロン酸について、正常および癌化した細胞間の細胞増殖速度への影響を調べるために、alarBlueTM assayで評価した。それぞれの細胞の培地のみでの増殖度を100%として評価した結果、正常なヒト皮膚線維芽細胞では、ヒアルロン酸の各分子量での細胞増殖速度の大きな変化はみられなかった。しかし、ヒト肝癌細胞であるHepG2細胞を用いた場合には、ヒアルロン酸の培地中での濃度の増加に従って、細胞増殖速度が速くなることが明らかになった。また、分子量80万のヒアルロン酸に比べて、分子量が小さくなると(31万、4万8千、4千8百)、細胞増殖速度が速くなる傾向も明らかになった。

ヒアルロン酸をはじめとする種々の多糖類の種類と分子量の違いによってヒト皮膚線維芽細胞のギャップ機能を含む生理活性や、接着挙動を明らかにすることができた。また、アニオン性の高分子であるヒアルロン酸の水溶液中での立体的な表面構造形成を示唆するAFM像から、アニオン性の高い表面が、初期段階でのヒト皮膚線維芽細胞の接着を阻害するものと考えられる。従って、ヒアルロン酸の分子量がヒト皮膚線維芽細胞の接着および増殖速度に深く関わる要因も、分子量による表面構造の違いから理解することができる<sup>2)</sup>。

## 2. 1. SLDT法と定量的画像解析法の比較

蛍光色素であるルシフェルイエローを含むPBS溶液と交換し、剃刀で、細胞にシャープな傷をいれ、その傷口から色素が細胞内に入り、ギャップ機能コネキシンチャンネルが開いていれば、隣の細胞にも、色素が移行し、顕微鏡下で光った細胞が観察される。組織培養用デッシュに播種したシャーレでの色素の広がり具合に比べ、ヒアルロン酸を添加した細胞では、色素の移行の程度が低い事が観察される。それに対して、ヒアルロン酸をコート後、ヒト皮膚線維芽細胞を培養し、同様にしてSLDT assayを行った。培地に添加した場合に比べて、ヒアルロン酸で、色素の広がりの程度は広くなり、色素の移行距離が伸びていることが観察された。特に、ヒアルロン酸の場合には、移行した色素の量に比例する光の強さも著しく増加していることが推察される。

次に、蛍光色素移行の絶対量変化は、移行の距離変化に比べてその程度は、大きく、ギャップ機能を正確に測定するために、更に、画像解析による、蛍光色素の絶対量測定に基づいた方法を検討した。その結果、画像解析による定量的ギャップ機能評価法を確立した<sup>3)</sup>。

すなわち、一定の面積をスキャンし、蛍光量の強さを積算して縦軸にlevelとして表し、剃刀の切り口からの距離をlengthとして横軸に示した。組織培養デッシュ上で生育したヒト

皮膚繊維芽細胞でのlevelとlengthで囲まれる色素の到達距離と移行量を示す面積を100%として換算して表すこととした。

800kDaのヒアルロン酸では、添加では、85.9%、コートでは、173.1%と逆に顕著な促進作用を数値化することが可能となった。前述の移行距離による評価では、9%程度の距離の増加を認めたのみであったが、細胞一つ一つに含まれる色素量は、視覚的にも増加しており、すなわち、細胞1個あたりのコネキシン機能の増加は視覚的には、判断されるものの、距離法であるSLDT assayでは、原理的に精度の高い数値となってあらわれにくい。蛍光色素量を評価できる画像定量法で、初めて、一個一個の細胞のコネキシン機能が評価可能となる。この評価方法は、細胞の真のコネキシン機能を評価可能とするため、必要で重要な試験法を確立したことになる。

## 2. 2. コネキシン機能とサイトカイン産生能

それでは、ギャップ機能がいかに重要であるのかを明らかにするために、ヒト皮膚繊維芽細胞の重要なサイトカイン産生機能について、検討することとした。

ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸AおよびCをコートしたデッシュ上でヒト皮膚線維芽細胞を培養し、細胞あるいは、培地中のbFGFおよびKGF量をElisa法で定量した<sup>3)</sup>。高分子量ヒアルロン酸マトリックス上のNHDF細胞は、bFGFおよびKGFの産生量が組織

培養用デッシュ上で増殖したヒト皮膚繊維芽細胞での産生量に比べ有意に高かった。一方、コンドロイチン硫酸では、bFGFの産生量は、逆に有意に減少していた。これらの傾向は、ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ機能に及ぼす多糖類の作用と相関性を示すことが明らかになった。

更に、bFGFは、細胞内の1000分の1、KGFでは、10分の1程度の量が培地中に検出された。コンドロイチン硫酸では、培地中のbFGFおよびKGF量がコントロールに比べて、2倍から4倍程度に高く、その原因は、コートしたコンドロイチン硫酸マトリックスがこれらのサイトカインを安定化させる作用に起因していることも明らかになった<sup>11)</sup>。このように、ギャップ機能への影響とその他の細胞機能との関係について検討した結果、NHDF細胞の重要なサイトカインであるbFGFおよびKGF産生量の変化には、相関性があることが多糖類を対象バイオマテリアルとした研究から明らかになった。

すなわち、ギャップ機能は、発癌抑制のみならず、細胞が恒常性を保ち、2種以上の細胞からなる組織内で、組織形成保持、組織再生・創傷治癒過程での分化発現を促進するために重要なサイトカインの産生を促す役割があることも明らかにすることができた。従って、我々が、一連の研究で示した方法により、優れた細胞外マトリックスとしては、高分子量ヒアルロン酸がその候補の一つであることを明らかにした。また、皮膚被覆材としてのコンドロイチン硫酸

の役割が、これまで明らかになっていなかったが、ヒアルロン酸やコントロールデッシュに比べ、bFGFやKGFを安定化する作用があることを明らかにすることができた。従って、ギャップ機能を亢進するヒアルロン酸マトリックスとギャップ機能亢進に伴って細胞からbFGFやKGFなどの重要なサイトカイン産生が高まり、そのサイトカインの活性を保持するためには、コンドロイチン硫酸がサイトカイン安定化マトリックスとして新たな役割を有している可能性を示唆した。

従来、皮膚の創傷被覆材としてのコンドロイチン硫酸の有効性が明確ではなかったが、この実験でその存在意義を明らかにすることができた。

ギャップ結合は細胞のホメオスタシスに重要な機能を担う器官であり、分子量1,000程度の物質が細胞間ギャップ結合のporeを通過できる。コネキシン6分子が集まり、中央にpore構造を有するコネキソンを形成する。隣接した細胞間でのコネキシソンのporeが連絡し、ギャップ結合となる。コネキシンは、ヒトで20種、マウスで19種の分子種が知られており、なかでもコネキシン43(Cx43)は生体に幅広く存在する事が知られているコネキシン分子である。我々のこれまでの研究から、材料で癌化したクローンは、いずれもコネキシン機能が低下しており、材料上に接着した細胞のコネキシン機能も低下している事から、材料で誘発される発癌過程において、コネキシン機能の低下が発癌

プロモーション機構として関与している事を明らかにしてきた。

ダクロン製人工血管材料として使用されているポリエチレンテレフタレート(PET)のギャップ結合細胞間連絡機能に及ぼす影響を調べた結果では、チャイニーズハムスター由来の細胞であるV79細胞による代謝協同を強く阻害したものの、ヒト血管内皮細胞では、PETの阻害活性は減弱し、また、PET材料との接着時間が長くなると阻害からの回復効果が認められた。原因として、ギャップ結合を構成するコネキシンの分子種により、チャネルの開閉に関わるC末側のペプチド配列が異なるため、V79細胞とヒト細胞で阻害作用の強さが異なるものと考えられた。材料・細胞間の界面の相互作用の結果引き起こされるコネキシン機能阻害の要因は、リン酸化酵素の活性化やcAMPを介したPKA活性の低下等が考えられる。細胞内のシグナル伝達系は、細胞の起源(ヒト由来、ゲッシ類由来)や組織・臓器の違いにより異なる。従って、同一の材料に接触しても、細胞内のリン酸化・脱リン酸化を主体とするシグナル伝達系が多様であるために、コネキシン分子へのリン酸化修飾パターンが異なることも容易に想定できる。

細胞・材料の界面反応を考える場合に、細胞が産生する細胞外マトリックスによるコネキシン機能の回復、材料に吸着した細胞外マトリックスや細胞成長因子の活性を保持した機能的マトリックスなどが、コネキシン分子の機能に大きな影響を与える事となる。例えば、ギャップ機能の

維持に正に働く、ファイブロネクチンやコラーゲン等の細胞外マトリックスの産生に伴って、機能が回復することは、ポリエチレンシート上に、ファイブロネクチンやコラーゲンをグラフト重合した我々の研究で既に明らかにしている<sup>8)</sup>。一方、アルブミンでは、そのようなコネキシン機能回復効果を認めていない<sup>9)</sup>。更に、細胞接着性最小ペプチドであるRGDによっても、コネキシン機能回復はなく<sup>9)</sup>、細胞の接着性の向上のみでは、生理学的に重要な機能を担うコネキシン機能を回復させることができないことも明らかにしている<sup>9)</sup>。従って、マトリックスの細胞接着性ドメインのみでなく、その高次構造や、他のサイトカインとの親和性等もコネキシン機能に関わっていることが考えられる。

bFGFは、線維芽細胞や血管内皮細胞の増殖や遊走を促進することから、創傷治療薬として期待され、臨床応用が角膜や皮膚を対象としてすでに開始されている。800kDaヒアルロン酸では、有意にbFGFおよびKGFの産生量が増加した。コネキシン機能亢進作用のない4.8kDaヒアルロン酸では、産生量の増加は認められなかった。

16kDaのコンドロイチン硫酸Aおよび34kDaのコンドロイチン硫酸Cでは、コネキシン機能を阻害することを明らかにしているが、bFGFの産生量もコントロールに比べて、いずれも低下していた。また、その低下量は、コネキシン機能を強く抑制するもの程、bFGFの産生量が低く、両機能に

は相関性があるものと推測される。bFGFは、ギャップ機能を亢進する作用が報告されている。従って、bFGFの産生量が多い場合、自己が産生したbFGFによって自らの細胞のコネキシン機能を促進している可能性も考えられるが、800kDaヒアルロン酸により、bFGFのみならずKGFの産生量も増加していることから、ギャップ機能の亢進により、FGFファミリーに属するサイトカインの産生量を一般的に増加させる作用があるものと考えられる<sup>3)</sup>。

### 3. 微粒子の評価

ポリエチレンは、人工関節の骨頭部分に使用され、関節という力学的負荷がかかることによる摩擦磨耗の結果、派生する磨耗粉の関節周囲組織や遠隔臓器への微細粒子の存在が指摘されている。微細粒子の生物影響については、ギャップ結合蛋白コネキシン機能について、V79細胞による代謝協同阻害試験法<sup>1)</sup>を用いて検討した。また、ポリエチレンは、癒着防止材としての使用例があるが、コラーゲン等の生体由来材料に比べて、生体への悪影響が懸念されている。我々は、ギャップ結合コネキシン機能に及ぼす影響について、最新のコネキシン機能評価方法である共焦点レーザー顕微鏡によるFluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法<sup>4)</sup>による細胞間連絡機能評価およびコネキシン蛋白分子の局在や分子変化を中心に検討した結果について報告する。

まず、はじめに、ポリスチレンお

よび低密度ポリエチレン粒子の評価を行った。人工関節を長期間使用していると、関節部分の緩みを生じ、人工関節の摘出という事態を招くことがある。その原因には、マクロファージや、破骨細胞が活性化し、その結果、炎症性のサイトカイン等を産生し、osteolysisを生じると考えられており、これらの現象を説明する多くの論文が知られている<sup>5)</sup>。我々は、細胞間連絡機能を行うギャップ結合機能に及ぼす影響を評価した<sup>6)</sup>。

研究方法： ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ乳酸の3種の高分子材料からなる微粒子が細胞間連絡機能に与える影響を、Chinese hamster 繊維芽細胞 (V79) を用いた代謝協同阻害試験によって評価した。

まず、ポリスチレン微粒子を用いて、その粒子径が細胞間連絡機能に与える影響を評価した。この際、予め微粒子を基質面に付着させておいた場合と、細胞が基質に付着した後に微粒子を添加した場合との2種類の系で実験を行った。その結果、後者の系では、微粒子の添加量および粒子径にかかわらず、細胞機能への影響は全く認められなかった。それに反して、前者の系では、細胞間連絡機能は微粒子の付着量が増大するとともに阻害が大きくなることが認められた。また、この機能は粒子径による影響も受け、 $0.1\mu\text{m}$ 径の微粒子による機能阻害の程度が最も大きいことが認められた。さらに粒子径が増大すると、 $0.5\mu\text{m}$ のもので阻害

が弱くなるものの $1\mu\text{m}$ および $5\mu\text{m}$ のもので再び阻害活性が高くなることが明らかになった。同一重量の粒子を付着させた時は、粒子径が小さい程、基質面にしめる面積は大きくなる。一方、田畑らは、マクロファージが貪食する粒子は $1\mu\text{m}$ 未満では粒子径が小さくなるほど貪食率が低く、貪食に至適な粒子径は $1-2\mu\text{m}$ の間であったと報告している<sup>7)</sup>。粒子の数を一定のレベルまで増やす程、阻害反応が大きくなっていることから、粒子の基質面への占有面積が大きい程、阻害反応は起こりやすい。一方、細胞と粒子との相互作用の結果、細胞が認識し、その結果生じる阻害反応には、粒子径に至適な範囲があるものと推測される。それらの影響が重なりあった結果、2相性の阻害反応が検出されたものと考えられる。繊維芽細胞による粒子認識能がマクロファージ等の貪食細胞と同様に粒子径に依存するかどうかは本結果からでは不明である。

粒子量および径に依存した細胞間連絡機能の阻害は、微粒子に普遍的なことなのか、あるいはポリスチレンに特異的なことなのかを明らかにするために、低密度ポリエチレン微粒子を用いて検討した。この場合には、粒子径は $6.4\mu\text{m}$ で、ポリスチレンに比べて大きい粒子径のものを用いたにも関わらず、ポリスチレンに比べ阻害活性は強かった。一方、細胞が一般的に取り込みにくいと考えられる粒子径 $13\mu\text{m}$ の場合には、 $6.4\mu\text{m}$ に比べて阻害反応は低く、占有面積がほぼ同じと考えられる実験系での結

果で比較しても、6.4 $\mu\text{m}$ の方が、13 $\mu\text{m}$ の場合よりも阻害活性が高い事が明らかになった。従って、おそらく、微粒子が細胞に阻害反応を起こす上で、細胞が微粒子を取り込む能力も関与している可能性が考えられる。

ポリエチレンでも、ポリスチレン微粒子の場合と同様に機能阻害の程度は微粒子の直径および付着量に影響を受けることが明らかとなった。次に、機能阻害に与える粒子径の影響について述べる。6.4~13 $\mu\text{m}$ の場合には、粒子径の増大に従って阻害活性が低下した。また、これらの微粒子も、ポリスチレン粒子同様、細胞付着後での添加は細胞間連絡機能を殆ど阻害しないことを確認した。すなわち、細胞が微粒子を基質面と同じ方向から認識した場合にのみ、その細胞間連絡機能に悪影響を及ぼすことが示唆された。また、ポリ乳酸から調製した粒径6.8 $\mu\text{m}$ の微粒子を用いて同様の方法で粒子量による影響を検討したところ、その阻害活性は認められなかった。

観察された微粒子による細胞間連絡阻害は、その微粒子が直接細胞間での物理的な障壁になっているためではなく、微粒子を何らかの方法で細胞が認識した結果引き起こされたものであることを示唆している。すなわち、微粒子による細胞機能阻害がその材質に影響されることを示しており、また、用いた方法を微粒子の評価として適用できる可能性を示している。

代謝協同阻害試験により、種々の材料からなる微粒子が細胞機能に与

える影響を評価できることが確認された。また、その影響の程度が、粒子材料および粒子径と粒子量に影響されることが認められた。しかしながら、この実験方法では、微粒子と細胞とが実際に接触している時間と細胞機能との関連を評価することができない。そのため、細胞間連絡機能を時間による影響も含めて評価することができる方法の開発が求められる。

代謝協同試験法の欠点を補う方法として、FRAP法がある<sup>4)</sup>。FRAP法を用いて、ポリエチレンシートおよび、種々の蛋白をグラフト重合したシートについて、コネキシン機能、コネキシン蛋白の細胞内局在性変化、コネキシン蛋白のリン酸化について以下に述べる<sup>8)</sup>。

(FRAP法) マウス由来のBalb 3T3 A31-1-1細胞をWadeら<sup>4)</sup>の方法に従って実験を行った。A31-1-1細胞をシャーレに播種し、細胞が接着後、試験粒子を添加、あるいは予め粒子を吸着させておいたシャーレに細胞を播種した。一定時間経過後、5,6-carboxy fluorescein diacetate を添加し、細胞内に蛍光物質を取り込ませた。洗浄により取り込まれなかった蛍光物質を取り除き、Meridian社製ACAS共焦点レーザー顕微鏡を用いて特定の細胞の蛍光を消失させた。その後、隣接細胞からの蛍光物質の流入を経時的に観察し、その流入速度を画像処理により算出した。この値から細胞間ギャップ結合連絡機能への影響を評価する<sup>8)</sup>。

ポリエチレンフィルム上で細胞を

培養した場合、細胞間連絡機能は微粒子の場合よりも強い阻害を受けることが明らかになった。ポリエチレンフィルム表面にBSAおよびコラーゲンをグラフト重合した結果、非接着性蛋白であるBSAでは、代謝協同阻害活性は、ポリエチレン表面に比べて少し低下したに留まった。コラーゲンでは、ポリエチレンで誘起された代謝協同阻害活性を有意に減弱させた。この細胞で機能しているコネキシン43は、ポリエチレンでは、細胞膜間に存在せず、細胞質、核に存在した<sup>8)</sup>。コラーゲンをグラフトした材料上では、その局在性は隣接した細胞膜間に、パッチ状に存在した。BSAでは、コラーゲンとポリエチレンとの中間の状態を示した。ウエスタンブロットによる細胞内コネキシン蛋白は、ポリエチレン上でのコネキシン蛋白量は最も低く、培養3日目でもコネキシン機能阻害性を示す高リン酸化コネキシンを発現していた。コラーゲンおよびBSAでは、機能の回復効果と相関した機能性コネキシン43の発現が観察された。コネキシンの機能を隣接細胞への色素移行速度で評価する方法 (FRAP法) および代謝されて致死物質となる化合物の隣接細胞への移行度をコロニーの形成能の低下で判定する方法 (V79代謝協同阻害試験法) で、ポリエチレン、BSAまたはコラーゲングラフトポリエチレンの3種のフィルム間において、前者はBalb3T3細胞、後者はV79細胞と細胞種は異なっても、コネキシン43というほぼ同じアミノ酸配列を有する分子種を共通してもつ細胞では、

外来の刺激に対するギャップ機能の応答調節は同様に機能し、どちらの試験方法でもギャップ機能連絡は、ポリエチレン<BSA<コラーゲンの順に高まった<sup>8, 9)</sup>。

#### 4. コネキシン遺伝子導入によるポリウレタンで癌化した細胞の正常化に関する研究

ポリウレタンをラット皮下に埋植し、埋植局部で発生した腫瘍からクローンを分離した。in vivoで腫瘍化したクローンのコネキシン (Cx) 43 遺伝子のコーディング領域であるExon 2の塩基配列を解析した結果、in vitro同様、変異はないことを明らかにしている。ウエスタンブロット法で、クローンから発現しているCx43蛋白量は、顕著に低下し、ギャップ結合連絡機能も低下していた。クローンのmRNAを抽出し、RT-PCR法で、遺伝子からの転写レベルを調べた結果、転写活性が低下していることが明らかになった。そこで、ポリウレタンの発癌過程にギャップ結合細胞間連絡機能の低下が重要な役割を担っていることを明確にするために、ポリウレタンをラット皮下に埋植して発生した腫瘍から分離したクローンU41にCx遺伝子を導入し、癌細胞の形態が正常化する可能性へを試みた。Cx43遺伝子導入実験は、ラットCx43 c DNAを発現ベクターに組み込み、遺伝子導入を行った。蛍光色素移行法でギャップ結合細胞間連絡機能を評価した結果、ラットの非腫瘍組織から分離したコントロール細胞のレベルまで、機能回復がみられた。また、



細胞の正常化について調べるために、足場非依存性増殖能について、軟寒天コロニー形成法で調べた結果、腫瘍クローンU41では、多数のコロニーを形成したが、U41-Cx43では、軟寒天中でコロニーを形成せず、正常細胞様の形態に近くなった。また、念のため、Cx43蛋白に対する抗体で免疫染色を行った結果、U41では観察されなかった細胞膜間のコネキシン蛋白がU41-Cx43では、正常コントロール細胞と同様に隣接した細胞膜間に存在した。従って、遺伝子導入によりCx43蛋白が細胞内で合成され、輸送された後、細胞膜中で機能性のコネキソンを形成し、集合してギャップ結合を形成することが明らかになった。

この結果より、ポリウレタンの癌化過程にコネキシン機能の抑制が関わっていること、また、その機能回復には、コネキシン遺伝子導入<sup>10)</sup>や、コネキシン機能を亢進させるバイオマテリアル(例:前述した高分子量ヒアルロン酸<sup>2)</sup>)を使用することがツールとなると思われる。

バイオマテリアルと接着した細胞の長期間安全性評価をする上で、コネキシン機能の果たす役割を明らかにし、その有用性が明らかになれば、バイオマテリアルの安全性評価を迅速に判断できる。その結果、細胞組織医療用具に使用する材料の開発、選別の段階で役立つばかりでなく、試験法が簡便なため、低コストで評価可能である<sup>12)</sup>。開発費のコストダウンと、安全性と有効性の高い医療用具の市場化を促進する。

#### 文献

- 1) T. Tsuchiya et al., J. Biomed. Mater. Res. 29, 113 (1995)
- 2) J. Park, T. Tsuchiya, J. Biomed. Mater. Res. (2002) accepted.
- 3) J. Park, T. Tsuchiya, Tissue Engineering (2002) accepted
- 4) M. H. Wade et al., Science, 232, 525 (1986)
- 5) W. Wang et al., J. Pathol. 182, 92, (1997)
- 6) R. Nakaoka et al., J. Biomed. Mater. Res. 57, 279 (2001)
- 7) Y. Tabata, Y. Ikada, Adv. Polym. Sci. 94, 107 (1990)
- 8) R. Nakaoka et al., J. Biomed. Mater. Res. 57, 567 (2001)
- 9) R. Nakaoka et al., J. Biomed. Mater. Res. 35, 391 (1997)
- 10) A. Ichikawa, T. Tsuchiya, Cyto technology (2002) in press.
- 11) J. Park, T. Tsuchiya J. J. Biomater. Sci. Polymer Edn submitted.
- 12) T. Tsuchiya, J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 11, 947 (2000).

## 調査報告 (19)

### 国際標準化機構／外科用インプラント専門委員会 (ISO/TC150) における 組織工学に関する活動

京都大学再生医科学研究所 堤 定美

国際標準化機構には医療用具に関係している約 10 の専門委員会がある。医療用具の種類を特定せず、全般にわたり水平的に生物学的安全性に関して審議している委員会として、TC 190 (医療用デバイスの生物学的評価) があり、組織工学によって作られた医療用具に関する規格化の検討が開始されているが、ここでは、人工股関節などデバイスごとに垂直的に規格を審議している TC 150 (外科用インプラント) でも 2001 年から新たに組織工学に関するワーキンググループ WG11 が設立されたので、その動向を報告する。

#### (1) ISO/TC150

図 1 のように TC150 には直轄の WG と SC またその下に WG がそれぞれ設置されている。TC150 直轄の WG 7 (医療用具に対する基本原則)、WG10 (埋入および摘出インプラントのデータ)、WG11 (組織工学で作られたインプラント) などごく最近になって編成替えされた WG とも深く関連している。

組織工学により製造された医療用具に関する規格を検討する WG11 が 2000 年に TC150 の直下に新設することが議決され、いよいよ審議が 2001 年から開始された。この WG11 (Tissue Engineered Implants) では当面は規格の策定を急がないで、ASTM や CEN など他の組織や各国の法制機関との連携を深めて、最新情報を収集することになった。

2000 年 9 月キャンベラでのこの第 1

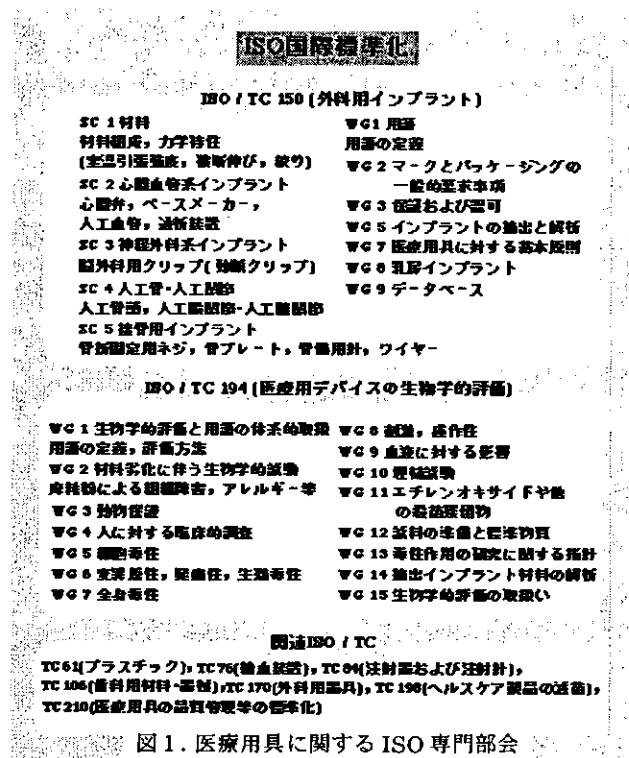


図 1. 医療用具に関する ISO 専門部会

回 WG では、豪、加、欧、蘭、日、米など各国の取り扱い規定や法規および当 WG が扱う Tissue Engineering の定義と調査項目について報告 (添付資料 - 2 ~ 3) と議論がなされ、定義の確定に向けて調整を図ることになった。

日本からの意見としては、Tissue Engineering TC150 の予備会議として開かれた Task Force 会議 (2000 年 5 月 ISO/TC194 湘南会議) で合意された内容 (添付資料 - 1) を承認し、2001 年 9 月時点において、わが国の Tissue Engineered Products に対する取組みおよび規制フレームワーク作りが、急速に進展したことを国立医薬品食品衛生研究所の土屋利江療品部長が伝えた。

今回最も議論されたことは、Tissue Engineering の定義 (添付資料 - 1) の妥当性と、この WG11 で取り扱うべき範囲についてであり、出席メンバ

一から活発な意見が続出した。Tissue Engineering といってもその範囲は、広げれば膨大なものになる。例えば、細胞の保存、バンク化まで範疇にいと、参加メンバーをもっと増やさないと無理がある。しかし、これらの分野は、すべて重要ではあるが、TC150 の特殊性を活かした内容の定義に留める、という方向で、大筋まとまった。

例えば、bone defect filler (骨欠損充填材) は non-viable な純人工材料が多く、WG11 の予備会議での定義では、範囲外になっている。しかし、この分野の製品は種類や生産量も多く、また、将来、この bone defect filler に生きた細胞を含めた真の組織工学的インプラントになりうることから、WG11 の活動の中に、bone defect filler device の標準化を行うことも TC150 に提言することで合意した。とくに、新しい世紀における人工関節では骨や軟骨と結合する機能を有することが望ましく、重要なことと位置づけできる。

WG11 では、米国 ASTM での最近の bone defect filler 領域の標準化について、国際標準化の観点からモニターすることとなった。FDA の Mr. Melkerson 氏が WG11 を代表して、ASTM との連絡役となることに同意した。

組織工学製品の品質評価の標準化に関して発展性を図る必要性が確認された。GMP も含めた国内、地域内の品質評価の標準化に関する最近の活動状況を更に集めることを全員で同意した。次回の会議では、もっと specific な提言をするために、これらに関する文書を WG11 で回覧し議論することとなった。

一方で、バイオマテリアル学会や組織工学会など、エキスパートが沢山いる学会等との連携も重要であるとの意見も出され、情報収集を求めることにした。

日本でもこの分野の研究活動は高いので、もっと積極的な提言をし、医療技術を変革する可能性のあるこの

分野に対する我が国の貢献と責任は益々重要である。1日も早く国内の審議団体あるいは専門家グループの選定・設置を行い、日本企業からの多くの参加が望まれる。今回の WG11 には日本から 1 企業の参加のみであった。

次回は 2002 年 9 月にアメリカ・ヴァージニア州・アレキサンドリアで開催の予定である。

## 日欧米規制内容一覧

### 日本における規制内容

- ①ヒト又は動物の細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の安全対策について(薬事法施行規則の一部を改正する省令等の施行について平成13年3月28日)
- ②中央薬事審議会報告書(平成12年12月)  
細胞・組織利用医薬品等の取り扱い及び使用に関する基本的な考え方  
ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針
- ③細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準(平成13年3月28日)
- ④GMPおよびGMPI関係省令の一部改正(平成13年3月28日)
- ⑤細胞・組織を利用した医療用具及び医薬品の品質及び安全性の確保につて(平成11年7月30日)
- ⑥ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について(平成12年12月26日)

### 米国FDAの規制内容

- ①Proposed Approach to Regulation of Cellular and Tissue-Based Products (1997年2月28日)
- ②Suitable Determination for Donors of Human Cellular and Tissue-Based Products; Proposed Rule (1999年9月30日)
- ③Current Good Tissue Practice for Manufactures of Human Cellular and Tissue-Based Products; Inspection and Enforcement; Proposed Rule (2001年1月8日)
- ④Guidance for Industry: Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Human (2001年2月7日)

### EUの規制内容

- ①Points to Consider on the Manufacture and Quality Control of Human Somatic Cell Therapy Mediclinal Products (2001年5月31日)

日欧米規制対比

<p>対象</p>	<p>ヒト細胞・組織由来医療製品に対する FDA の提案 (米国) (1997年2月28日:ドケット No.97N-0068)</p> <p>I.「緒言」中に、規制の除外対象を記載</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>血管性腫瘍または操作を最小限に止めた骨髄 (別規制あり)</li> <li>血液製品 (全血、血球など)</li> <li>動物由来組織</li> <li>細胞又は継代用製品、細胞・組織から分泌、抽出した製品 (母乳、コラーゲン、ウロキナーゼ、サイトカイン、成長因子など) 上記は除外対象</li> </ul>	<p>細胞・組織医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方 (日本) (2000年12月:中央薬事審議会報告書)</p> <p>「1. 3. 定義」 ヒト又は動物の細胞・組織から構成されたもの (自己の細胞・組織を原料とするものも含まれるが、血液製剤は除外する)</p>	<p>ヒト体細胞を用いた医療製品の製造、品質管理に関する考え方 (欧州) (2001年5月31日)</p> <p>「Appendix」に事例として記載</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>自己或いはHLA適合の他家造血幹細胞疫与</li> <li>リンパ球のような免疫細胞を ex vivo で精製、増加、活性化し、その後、in vivo 免疫治療</li> <li>複雑な生物学的機能、或いは損傷、欠損組織の補充として設計された組織特異的な修飾した細胞集団の移植</li> <li>ex vivo で遺伝的な修飾を受けた自己腫瘍細胞</li> <li>癌、自己免疫疾患、遺伝的疾患の治療治療用の遺伝子治療に用いられる血液幹細胞を用いた治療</li> </ol>
<p>【対象】</p>	<p>ヒト由来の細胞・組織に限定 血液製剤を除く</p>	<p>「第2章細胞・組織採取について」 第1章採取医療機関</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>衛生上の管理、人員</li> <li>倫理委員会:要件</li> </ul> <p>第2章同意</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>文書同意</li> <li>代諾、死亡時の取扱い</li> <li>手術での抽出細胞・組織利用も「同意」</li> <li>動物福祉</li> </ul> <p>第3章無対価</p> <p>第4章ドナー選択基準、適格性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>特定ウイルス感染 (HBV,HCV,HIV,成人 T 細胞白血病, パルボウイルス B19) は問診、検査で否定する。</li> <li>既往等確認必要:梅毒、クラミジア、淋菌、結核菌、敗血症、悪性腫瘍、重篤な代謝・内分泌疾患、膠原病、血液疾患、肝疾患、痴呆 (CJD)</li> <li>ただし自己由来については、必ずしもドナースクリーニングの必要なし。</li> <li>オフビビッドの設定</li> <li>ドナー動物:内性レトロウイルスを考慮</li> </ul> <p>SOP作成、飼育環境整備、適格性の基準設定、動物福祉</p> <p>第5章採取の適切性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>微生物等の汚染防止対策</li> <li>死体:提供者に対する礼意の保持</li> </ul> <p>第6章記録</p>	<p>ヒト (自家、他家) 由来の細胞利用製品に限定</p>
<p>細胞・組織採取に関する事項</p>	<p>IV.各問題領域に影響する製品の要因</p> <p>A) 伝染性疾患の直接伝播</p> <p>自家利用/他家利用/貯蔵/アフリガ</p> <p>V.規制計画等</p> <p>A) 伝染性疾患の直接伝播</p> <p>1) 概要: A1 管理不要 A2 管理必要</p> <p>2) 規制要件</p> <p>A1:同一手術内の自己由来 ⇒規制管理主張せず</p> <p>A2:他家細胞と同一場所貯蔵、輸送、加工される自己由来・他家由来 ⇒規制管理対象</p> <p>A2a 自己:同一液体窒素内で相互汚染の可能性などあり ⇒アクリニグとテストを勧告。</p> <p>ウイルス検査要件は、ウイルスの生育可能白血球の有無でわかれる。</p> <p>自家、配偶者のアクリニグ、テストは勧告 ⇒伝染性疾患リスクが少ない。</p> <p>既に伝染性疾患を移されている可能性あり。この理由から、リスク関係性結果のためドナー由来細胞、組織も「表示」は要請されるが、ドナーの同意により利用可能。</p> <p>(関連規制: PHS 法 361 条)</p>	<p>「1.2 ドナー選択のための評価基準」 1.2.1 他家ドナー</p> <p>「EC」における供血者アクリニグ、供血者適合性ガイドライン</p> <p>「血液成分の準備、使用、品質保証への欧州協議会のガイドライン」</p> <p>「血漿製剤のガイドライン」等を参照</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>HIV, HBV, HCV 等の暴露リスクは除外</li> <li>放射線暴露等の治療履歴を考慮、適切なテストの実施</li> <li>遺伝疾患、治療歴、家族歴など</li> <li>免疫欠損、マイコン、アフリガ、レナリク等のおおそれは除外</li> <li>感染物質への暴露リスクのあるものは除外、集めた場合は廃棄</li> <li>選択手順の明確化</li> <li>プール細胞のリスク管理必要</li> </ul> <p>1.2.2 自己由来細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>細胞の同一性の確認必要</li> <li>「自己使用専用」のラベル表示</li> <li>「品質評価」は他家細胞と同様</li> </ul>	<p>「第2章細胞・組織採取について」 第1章採取医療機関</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>衛生上の管理、人員</li> <li>倫理委員会:要件</li> </ul> <p>第2章同意</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>文書同意</li> <li>代諾、死亡時の取扱い</li> <li>手術での抽出細胞・組織利用も「同意」</li> <li>動物福祉</li> </ul> <p>第3章無対価</p> <p>第4章ドナー選択基準、適格性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>特定ウイルス感染 (HBV,HCV,HIV,成人 T 細胞白血病, パルボウイルス B19) は問診、検査で否定する。</li> <li>既往等確認必要:梅毒、クラミジア、淋菌、結核菌、敗血症、悪性腫瘍、重篤な代謝・内分泌疾患、膠原病、血液疾患、肝疾患、痴呆 (CJD)</li> <li>ただし自己由来については、必ずしもドナースクリーニングの必要なし。</li> <li>オフビビッドの設定</li> <li>ドナー動物:内性レトロウイルスを考慮</li> </ul> <p>SOP作成、飼育環境整備、適格性の基準設定、動物福祉</p> <p>第5章採取の適切性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>微生物等の汚染防止対策</li> <li>死体:提供者に対する礼意の保持</li> </ul> <p>第6章記録</p>

<p>組織採取 に関する 事項』ま とめ</p>	<p>分類 自家同一手術内：規制管理主張せず 他家及び他家と同一場所で扱われる 自家：規制管理対象 感染のある細胞・組織でも患者同意で使用可能 (自己の場合、自己専用の表示は必要) 【伝染性疾患の伝播防止が目的】 B1：1回の外科手術で回収、移植されるもの；自家皮膚、静脈等 ⇒FDA管理外 B2：伝染性疾患の伝播防止を目的に管理；精液；精液；ヒト心臓弁、凍結乾 燥非脱灰骨、貯蔵組織、末梢・胎盤・臍帯幹細胞等⇒市販前承認不要 B3：伝染性疾患の防止+臨床的安全性及び有効性を保証。；修飾造血幹 細胞、脱灰骨、ラゲーン又は成長因子配合骨等⇒市販前申請必要 【加工、臨床的安全性、有効性に影響する因子】 a) 非細胞性非組織成分との組合せ有無 b) 操作：「最低限の操作」-組織本来の特性が変化しない。 「有意な操作」-細胞組織の特性が変化する場合、変化するかどう か適切な情報がない場合。 最新では「細胞選別」は「最低限の操作」。「細胞増幅」、「活性化」、 「活性化」、「遺伝子修飾」などは「有意な操作」。 c) 本来の機能及びそれ以外の機能 本来機能利用-長骨⇒脊椎 心臓⇒硬膜、心臓 皮膚⇒皮膚 など それ以外の機能-羊膜⇒角膜 d) 代謝機能；より大きな安全性、有効性問題の発生の可能性。 e) 生殖機能 f) 構造機能</p>	<p>ドナー同意をとる。 無対価の原則 ドナー選択：GMP否定試験 自家では必ずしも必要ではない ドナー動物：内在性ウイルスへの考慮必要 採取の適切性、記録の保管 第3章 製造段階における安全性確保対策 第1章 品質管理GMP ・製品特性に通った一貫した品質GMPの構築 ・作業区域区分の明確化 ・交叉汚染防止しうる保管体系 標準操作手順書、材料受け入れ製品・中間品の検査 ・工程中の細菌、真菌、ウイルス汚染防止 ⇒ドナーカウチング記録、工程バリション、不活化導入 ・検疫、出荷、配送 カウチング、製品検査等終了後の出荷 ・製造工程の記録の保管は、製品の最 終有効期間終了日より10年以上。 最新の技術の反映</p>	<p>ガイドライン等より構成。 ドナー既往歴、家族歴等の確認。 自家：『自己使用専用』表示必要。</p> <p>【製造工程に関する記載事項】 ・基本的には、材料、工程における微生物、ウイルス及び伝 染性物質の管理を主体とした内容。 ・交叉汚染；ヘテロな細胞集団、工程・保存における管理 ・細胞の培養中の変化等について考慮；細胞の特定化、機 能評価など ・細胞の保存方法、評価項目</p>
<p>全体 まとめ</p>	<p>・ヒト由来に限定 ・他家、生、死、由来マトリックスすべて含む。 ・規制対象は『同一手術内のヒト自己』以外はすべて ・自己、他家のリスク上の区分明示 ・伝染性疾患の伝播防止を主に、加工管理、臨床上の安全性 有効性、表示、登録の規制の考え方を提示</p>	<p>・ヒト(自己、他家)、動物、生・死、由来マトリックスすべて 含む。 ・伝染性、伝達性疾患防止 ・倫理規定詳細(倫理委員会構成、無対価の原則等)含む</p>	<p>・生きているヒト細胞を対象に、それらを利用医薬品とし て位置付け ・血液製剤のガイドラインを準用 ・加工細胞の機能評価、一様性についても言及 ・自己、他家のリスク上の区分に置及</p>

**Draft report to CEN/BT from the CHeF Forum Task Group on Human Tissues**

**Human tissue engineering and the possible future needs  
for European standardization**

**Terms of reference of the CHeF Forum Task Group "Human tissues"**

Recognizing the growing number of human tissue-engineered products entering the market, the likelihood of European regulation in this area and the growing number of CEN and ISO Technical Committees expressing an interest in the field of human tissues, the CEN Healthcare Forum (CHeF) decided to establish a Forum Task Group (FTG) to review the situation.

The objectives set for the FTG "Human Tissues" were:

- to review initiatives concerning possible European regulation of human tissues
- to review existing standardization initiatives in this field
- to investigate the needs of stakeholders for possible European standardization in the field of human tissues
- to prepare an overview of the types of medical technology products utilizing human tissues
- to draft recommendations to the CEN/BT on how best to proceed.

**Regulatory background**

Attempts to regulate medical technology products utilizing tissues or cells of human origin at European are not new. In the early 1990s it was planned to include the subject of medical devices utilizing human tissues in the then draft Medical Device Directive (MDD) but, due to a lack of agreement at Council level, the matter was excluded from the finally-adopted MDD. Further attempts were made to include the subject by revision of the MDD at the time of adoption of the In Vitro Diagnostic Medical Devices Directive (IVDMDD) but again agreement could not be reached at Council level.

There is, therefore, currently a regulatory vacuum in relation to human tissue engineered medical technology products at European level.

In the absence of European regulation, some Member States have proceeded to adopt national legislation covering human tissue products. These range from approaches closely following the medical device approach to including human tissue products under medicinal

products legislation. In some other Member States, there are no regulations at all for this class of products.

Attempts have been made by some stakeholders, including industry, to stimulate initiatives at European level concerning regulation of human tissue products, particularly in the light of the rapid growth of this technology and the increasing number of human tissue products coming on to the market.

In recent weeks, the European Commission (DG Enterprise) has initiated discussions on how to address the regulation of human tissue products at European level and expects to finalize a report by mid-2001. The options open to the Commission appear to be:

1. To include human tissues under the MDD "new approach" system.

This appears to be very unlikely given the sensitivity of some Member States on the subject, e.g. in relation to transmission of nvCJD and other infectious agents and on ethical questions, and in the light of previous failures to adopt this solution.

2. To include human tissues products under medicinal products regulations.

There are strong voices within some Commission departments and Member States for this approach. However, other departments and stakeholders, including industry, do not believe the medicinal product approach to be appropriate for a large proportion of human tissue products which have a mechanical or device-like action within the body rather than a systematic pharmaceutical-like action.

3. To draft a specific new regulation for human tissue products.

This approach is currently favoured by industry and appears to be supported by some Commission staff and advisors handling the file. Some suggestions have been mooted to include also other tissue-engineered medical technology products (e.g. animal tissue products) in this approach due to the sensitivity of some Member States on these related products. Such an approach could deal with both "placing on the market" and safety issues, and ethical considerations.

The Commission is currently undertaking discussions with relevant stakeholders to ascertain the types of products and technologies involved and to obtain input for its report on how best to proceed.

#### **Standardization background**

Within CEN, the most closely related work to date has been in CEN/TC 316 "Medical devices utilizing tissues". This TC has produced three standards, EN 12442: Parts 1 to 3, covering animal tissues utilized in medical devices that have now been ratified (March 2000). CEN/TC 316 includes human tissues within its scope although no work items have yet been initiated on this subject.

Besides CEN/TC 316, a number of other CEN and ISO Technical Committees have an interest in human tissue products:



- CEN/TC 285 (+ ISO/TC 150) CEN/TC 285 and its ISO counterpart, ISO/TC 150, which address surgical implants, have both expressed an interest in human tissues in relation to various types of implant.
- CEN/TC 206 (+ ISO/TC 194) CEN/TC 206 and its ISO counterpart, ISO/TC 194, are both interested in human tissues from a biological safety perspective.
- CEN/TC 55 and CEN/TC 170 and their corresponding international counterparts (ISO/TC 106 and ISO/TC 172/SC 7) have a potential interest in relation to dental and ophthalmic implants which are addressed within those committees rather than in CEN/TC 285 and ISO/TC 150.
- ISO/TC 210 (the horizontal ISO committee for medical devices) has expressed an interest in both taking over EN 12442:Parts 1 to 3 and in the area of human tissues. Further discussions are scheduled for its forthcoming meeting in April 2001.

In addition, ASTM F04 Division IV has an extensive, mainly vertical, standardization programme on (human) "Tissue engineered medical products" (TEMPS).

### **The need of European stakeholders**

#### **Industry**

Currently there are neither European regulations nor European Standards in the field of human tissue engineered medical technology products.

For industry, this presents an unsatisfactory and confused situation in the marketplace. Differing requirements and approaches are required from country to country resulting in greatly increased costs in placing products on the market and a disincentive to investment in R&D.

EUCOMED, as the largest European medical technology industry association, has drawn the attention of European regulators to the need for an effective, risk-management based European regulation on human tissues with patient safety as the prime consideration. EUCOMED considers that a limited number of "horizontal" standards could support the requirements of such future European legislation although it is recognized that full "new approach" type legislation may not be acceptable to Member States.

#### **Regulators**

*The European Commission.* The European Commission has, in the first months of 2001, initiated a study on the form and possible content of future European legislation covering products derived from human tissues. Dialogue with key stakeholders is currently under way and the Commission expects to deliver a report by mid-2001. A central question to be addressed in the study will be whether a specifically drafted standalone Directive or linkage to existing regulatory systems, e.g. "new approach" or medicinal products will be pursued.

Initial discussions with the Commission staff concerned suggests that there is some support for a limited number of "horizontal" standards to support the future European legislation.

***National regulatory authorities.*** Some national regulatory authorities have been represented on the FTG "Human Tissues" (see annex A). The general initial reaction amongst those represented is that there may be a role for standardization in some clearly defined areas such as risk management, terminology, biological safety, etc.

#### **Other Stakeholders**

It is important to note that, in addition to commercial companies, tissue engineered products may be developed and placed onto the market (in the legal sense) by other entities such as tissue banks. Some attempts have been made to involve representatives of these groups in the discussions within the FTG "Human tissues" and it is important that any future standardization work should encompass such groups. Those groups represented on the FTG have also accepted the possible role for a limited number of standards in this area.

Other important stakeholders include patient groups, medical professionals, the pharmaceutical industry and reimbursement bodies.

#### **Types of products utilizing human tissues**

Tissue engineering has been defined by the FTG "Human tissues" (for the purposes of this report only) as:

***Tissue Engineering: the development and manufacture of therapeutic products utilising non-viable substances, derivatives and tissues of human origin and/or viable cells of human origin, with or without scaffolds/matrices.***

***Specifically excluded from this definition are embryos, gametes and reproductive tissues, blood, plasma, solid organs for transplantation, stem cells, tissues stored for the purpose of obtaining genetic information, products falling under the scope of medicinal products regulations.***

Taking into account this definition, an inventory has been drawn up of medical technology products on the market or in development utilizing human tissues. This inventory is presented in tabular form in annex B.

#### **Discussions concerning standardization needs**

Following extensive discussions over several meetings, it was agreed that vertical standards of the type under preparation within ASTM F04 Division IV would probably be inappropriate in the European context. Links, however, should be maintained with the ASTM Committee to ensure exchange of information and cooperation, where possible.

It was agreed by consensus that there was probably a role for a limited number of "horizontal" standards in subject areas that would be difficult or inappropriate to cover in detailed future legislative texts. Ideally, these should be developed in an International (i.e. ISO) forum under the proviso that the final standards would be suitable for European needs.

The following subjects were listed as possible candidates for future standardization:

- **Quality systems:** It was considered important that quality system standards such as ISO 9000:2000 and the future revised ISO 13485 should be reviewed and augmented where necessary with supplementary requirements covering the needs of human tissue based medical technology products. ISO/TC 210 has expressed an interest in this area of work and discussions on the topic are due to take place at its forthcoming meeting (April 2001)
- **Biological safety:** Additional biological safety standards covering human tissue products may be necessary. Ideally, these should form an extension of the EN ISO 10993 series prepared by ISO/TC 194/CEN/TC 206.
- **Risk management of human tissues:** It was considered essential that a standard be developed for the risk management of human tissue products as has already been done for animal tissues (EN 12442-1:2000 *Animal tissues and their derivatives utilized in the manufacture of medical devices – Part 1: Analysis and management of risk*). This should be based broadly on the new ISO standard covering risk management of medical devices, ISO 14971:2000, and could be along the lines of EN 12442-1:2000.

CEN/TC 316/WG 1 could be a possible "home" CEN Technical Committee to oversee the development of such a standard although, ideally, the work should be done internationally.

*NOTE: RIVM is just finalizing a report on the use of ISO 14971 for human tissues and has concluded that this standard is a good basis both for risk management aspects and also for microbiological control of the source materials.*

- **Microbiological safety**

It was considered that classification, if required, was more the role of future European legislation. There appears to be no "natural" home for this within the CEN healthcare Committees although CEN/TC 316 could be asked to look after this subject. Ideally, the subject should be approached from an international perspective.

- **Terminology & definitions:** This was considered an essential item. Some work has already been done within ASTM F04 Division IV that could form a useful starting point for such work.

CEN/TC 316/WG 1 could be a possible home for such work. Again, an international approach would be preferable.

- **Sourcing/inactivation:** This is a part of full quality assurance, i.e. microbiological safety of the starting products, and should be aligned with tissue banks protocols.

CEN/TC 316/WG 2 could be a possible home for such work. Again, an international approach would be preferable.

- **Horizontal implant standards:** CEN/TC 285 and ISO/TC 150 should further investigate the need for any horizontal standards for human tissue based implants, taking into account relevant ASTM work. Vertical, highly-specific standards should be avoided.

## Recommendations to the CEN/VT

### Recommendation 1

CEN/TC 316 should further evaluate the feasibility of preparing European standards for:

- Risk management of medical technology products utilizing human tissues
- Microbiological safety of medical technology products utilizing human tissues
- Terminology and definitions for medical technology products utilizing human tissues
- Issues related to the selection and collection of human tissues for subsequent use in medical technology products
- Inactivation of viruses and other transmissible agents in human tissues intended to be used in medical technology products

Ideally such work should be developed internationally with CEN/TC 316 monitoring progress to ensure suitability for European regulatory requirements.

### Recommendation 2

CEN/TC 206 should investigate the feasibility of preparing standards covering the biological safety of medical technology products utilizing human tissue products, possibly as part of the EN ISO 10993 series, in collaboration with ISO/TC 194.

### Recommendation 3

The CEN/CENELEC Coordinating Working Group on Quality Supplements (CEN/CENELEC CWG QS) should investigate the feasibility of preparing supplementary requirements to ISO 9001:2001/ISO 13485 in relation to medical technology products utilizing human tissues. This should be in collaboration with a suitable ISO Committee, e.g. ISO/TC 210/WG 1.

### Recommendation 4

CEN/TC 285 should investigate the need for horizontal standards concerning the use of human tissues as implants, taking into account the work done already in ASTM F04 Division IV, and in collaboration with ISO/TC 150.

### Recommendation 5

The CEN Healthcare Forum (CHeF) should continue to closely monitor the evolution of European legislation covering human tissues and coordinate the work detailed under Recommendations 1 to 4 above.